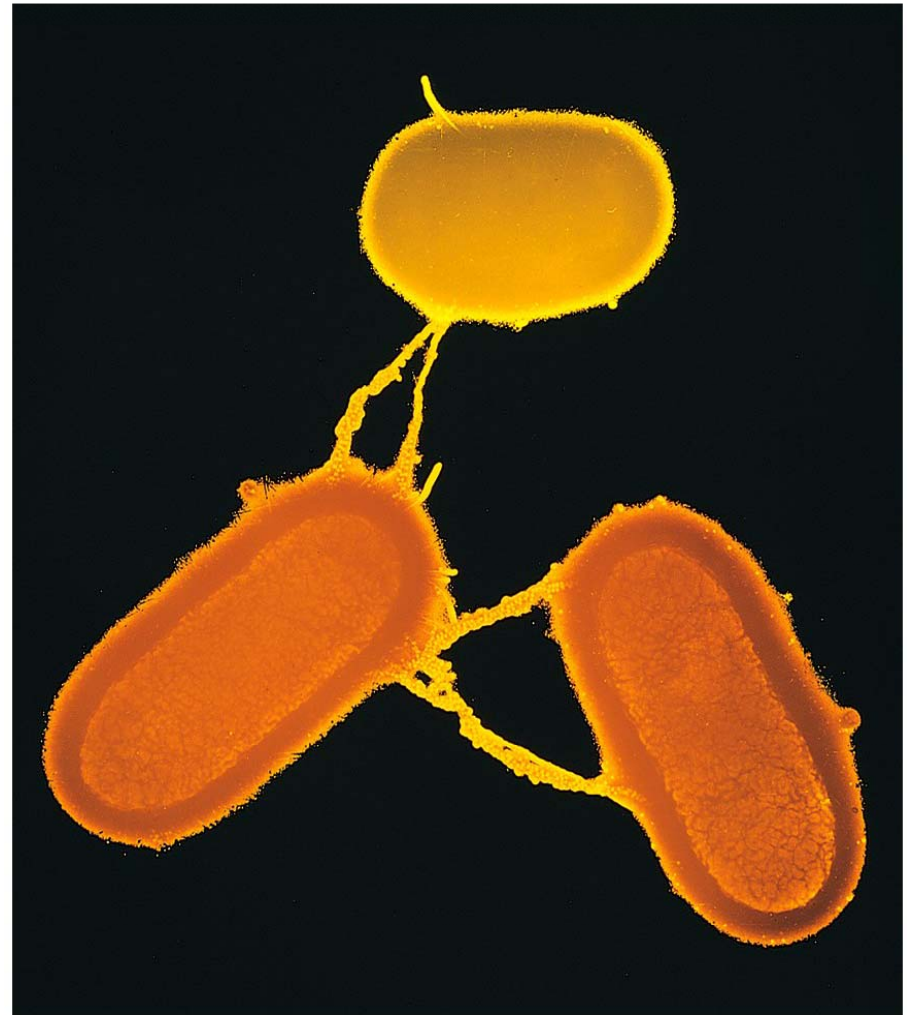


6. DNA - Bakteriengenetik

Konzepte:

- ➡ DNA enthält Gene
- ➡ DNA Struktur
- ➡ DNA Replikation
- ➡ Gentransfer in Bakterien
- ➡ Bakteriophagen

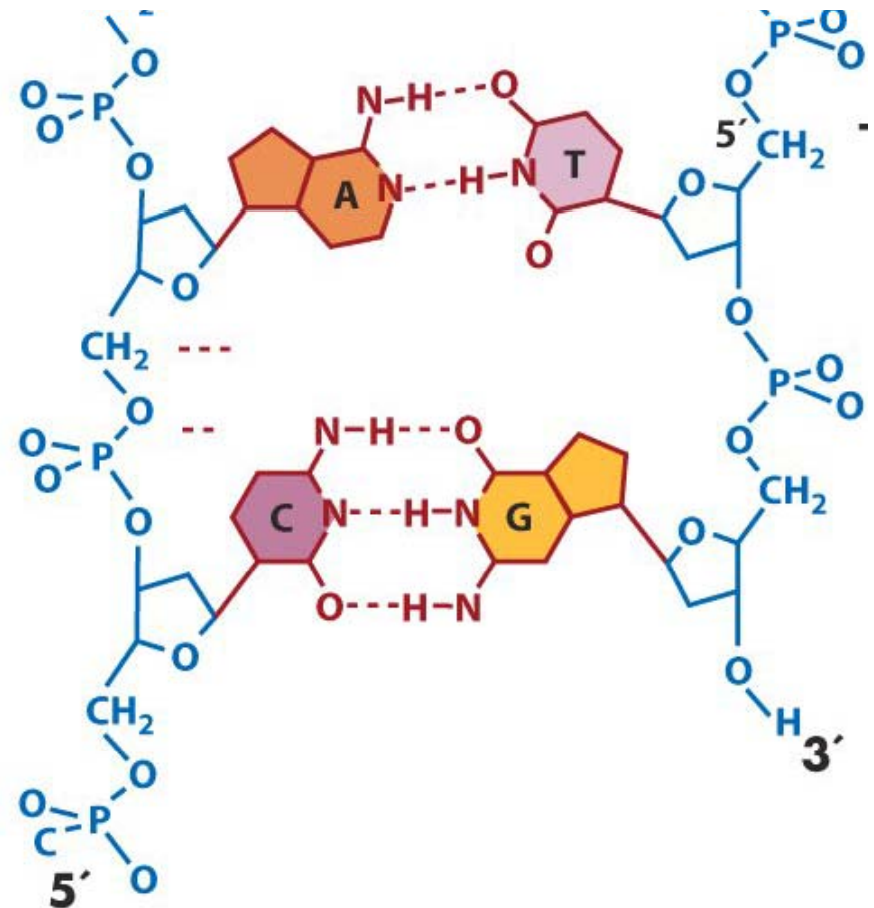


2. Welcher der folgenden Sätze entspricht der Chargaff-Regel?

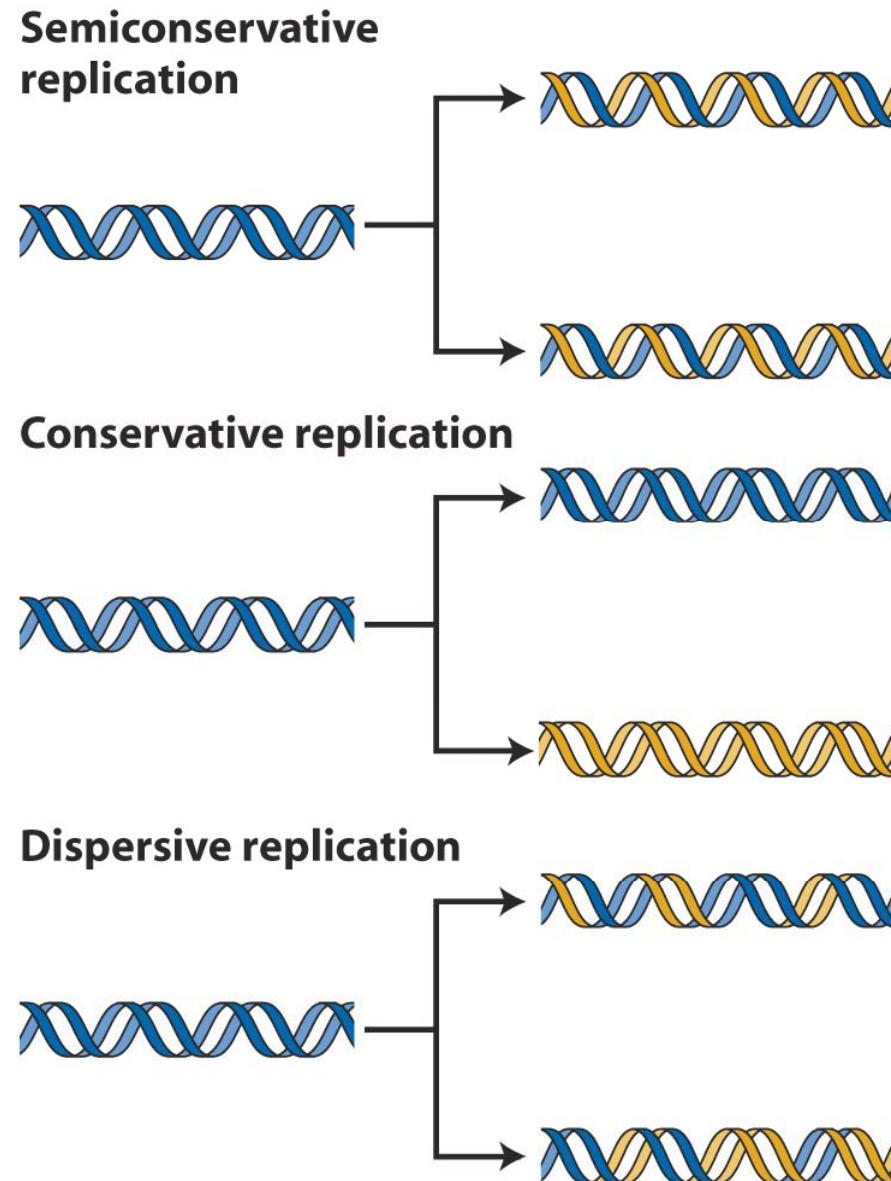
- A) Die Menge von Purinen (T und C) entspricht der Menge an Pyrimidinen (A und G).
- B) Die Menge von Purinen (T und A) entspricht der Menge an Pyrimidinen (C und G).
- C) Die Menge eines einzelnen Nukleotids bestimmt nicht die Menge der anderen Nukleotide.
- D) Die Mengen aller Nukleotide sind gleich.
- E) Keiner der obigen Sätze.

Erwin Chargaff:

- 1. Die Gesamtmenge der Pyrimidinnukleotide (T+C) entspricht der der Purinnukleotide (A+G)
- 2. Die Menge an T ist immer = A
- 3. C = G

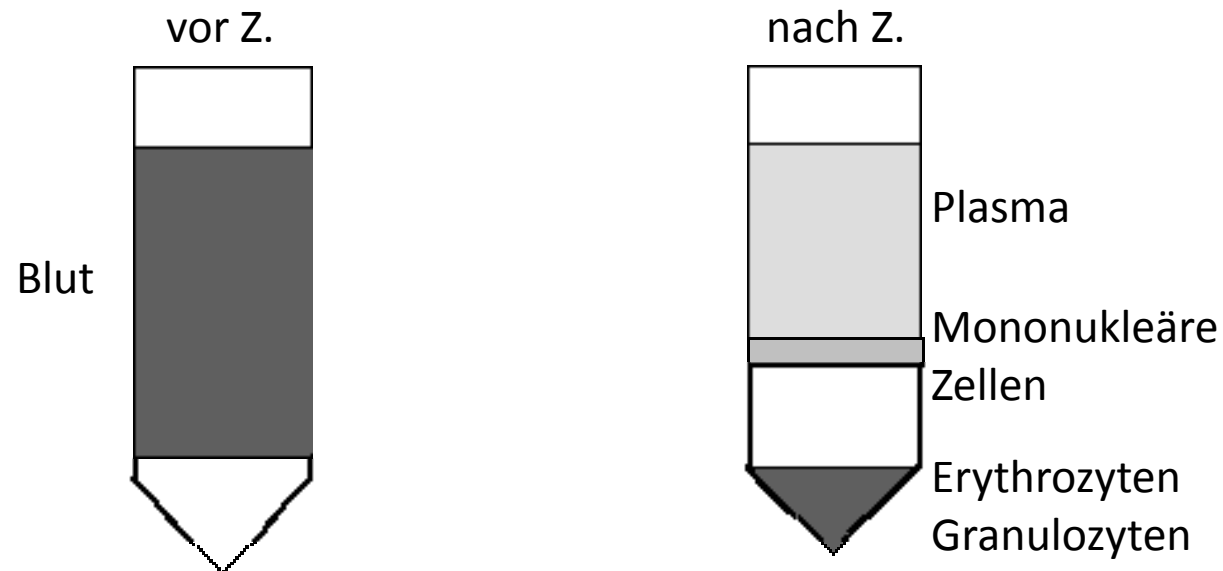


3. Durch welches Experiment wurde gezeigt, dass die DNA-Replikation semikonservativ erfolgt?



Dichtegradientenzentrifugation

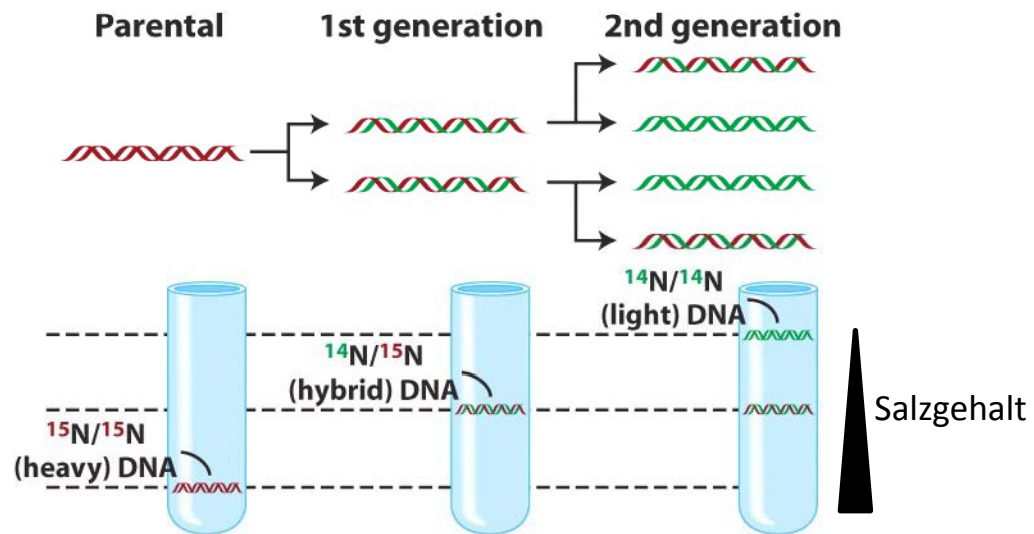
Beispiel Blut:



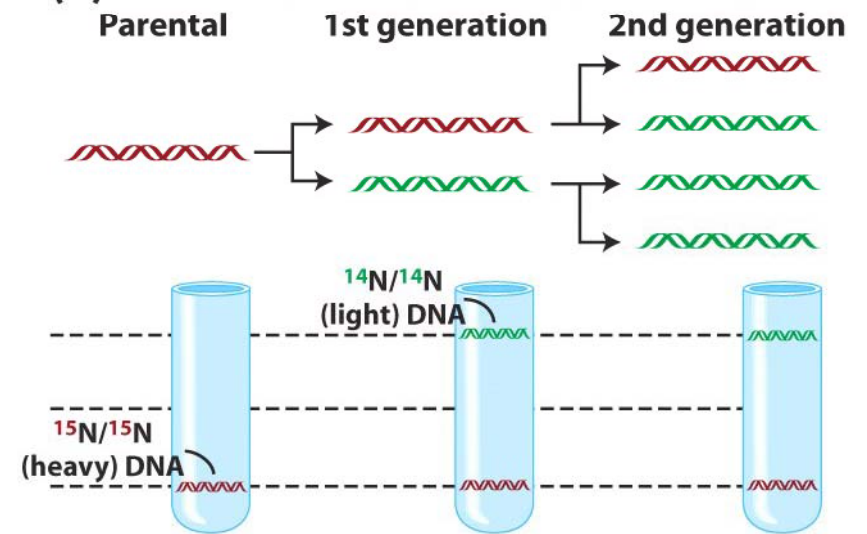
Meselson und Stahl (1958):

1. ^{15}N -DNA Zellen in ^{14}N -Medium
2. Nach erster Zellteilung zentrifugieren
3. Nach zweiter Zellteilung zentrifugieren

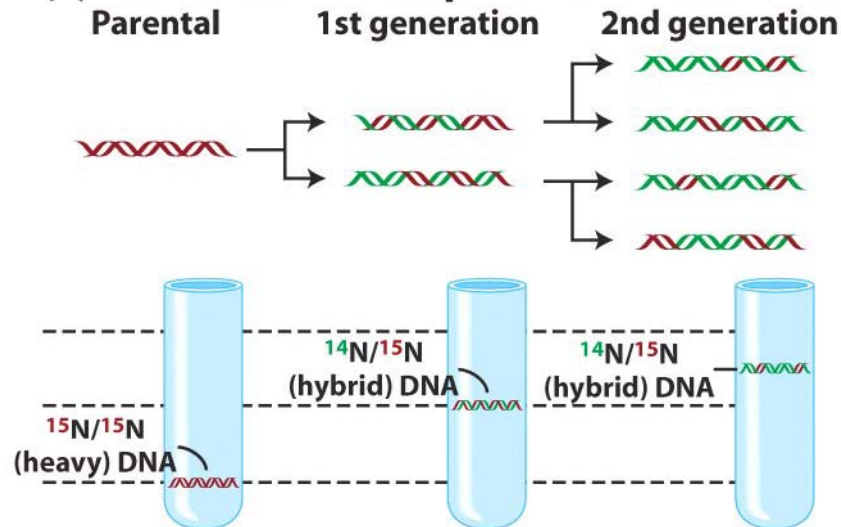
(a) Predictions of semiconservative model



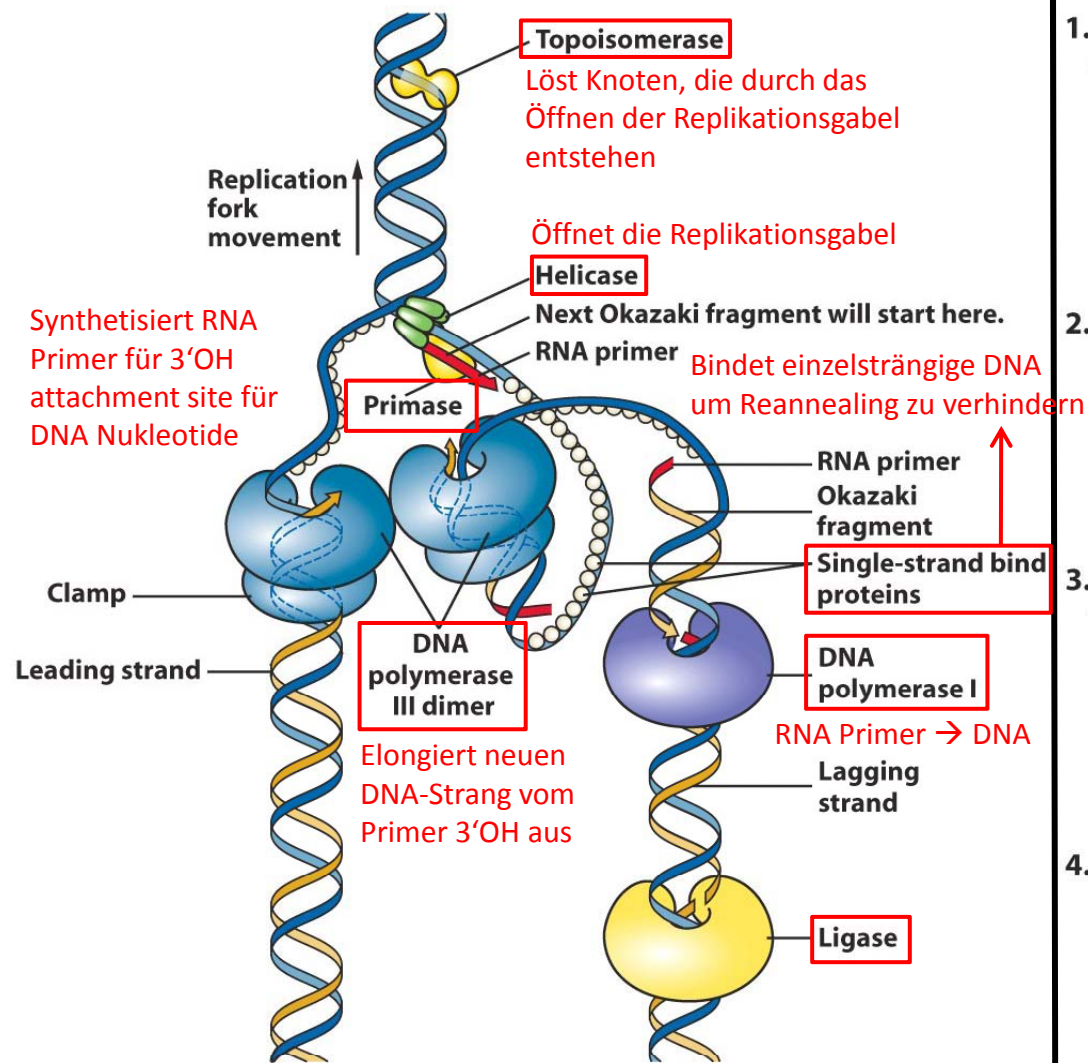
(b) Predictions of conservative model



(c) Predictions of dispersive model



1. Zeichnen Sie eine Replikationsgabel bei *E. coli*. Kennzeichnen Sie dabei die alten und neuen DNA-Stränge sowie die Position der Primer.



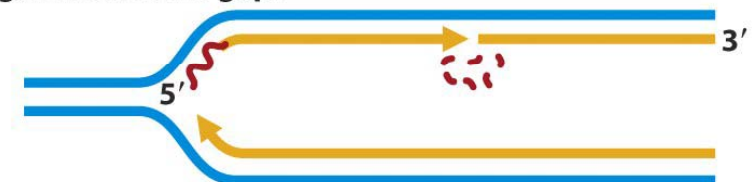
1. Primase synthesizes short RNA oligonucleotides (primer) copied from DNA.



2. DNA polymerase III elongates RNA primers with new DNA.



3. DNA polymerase I removes RNA at 5' end of neighboring fragment and fills gap.



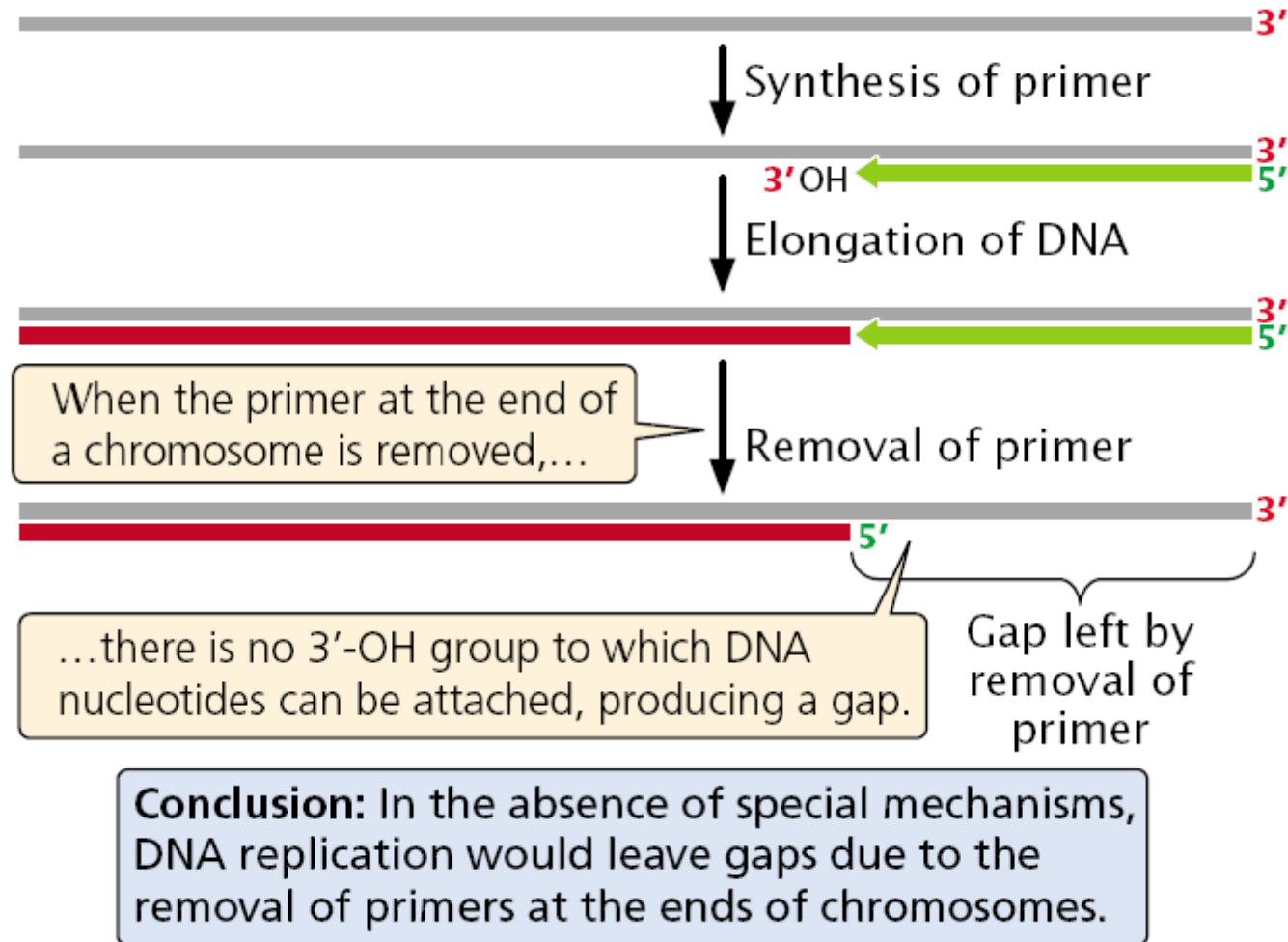
4. DNA ligase connects adjacent fragments.

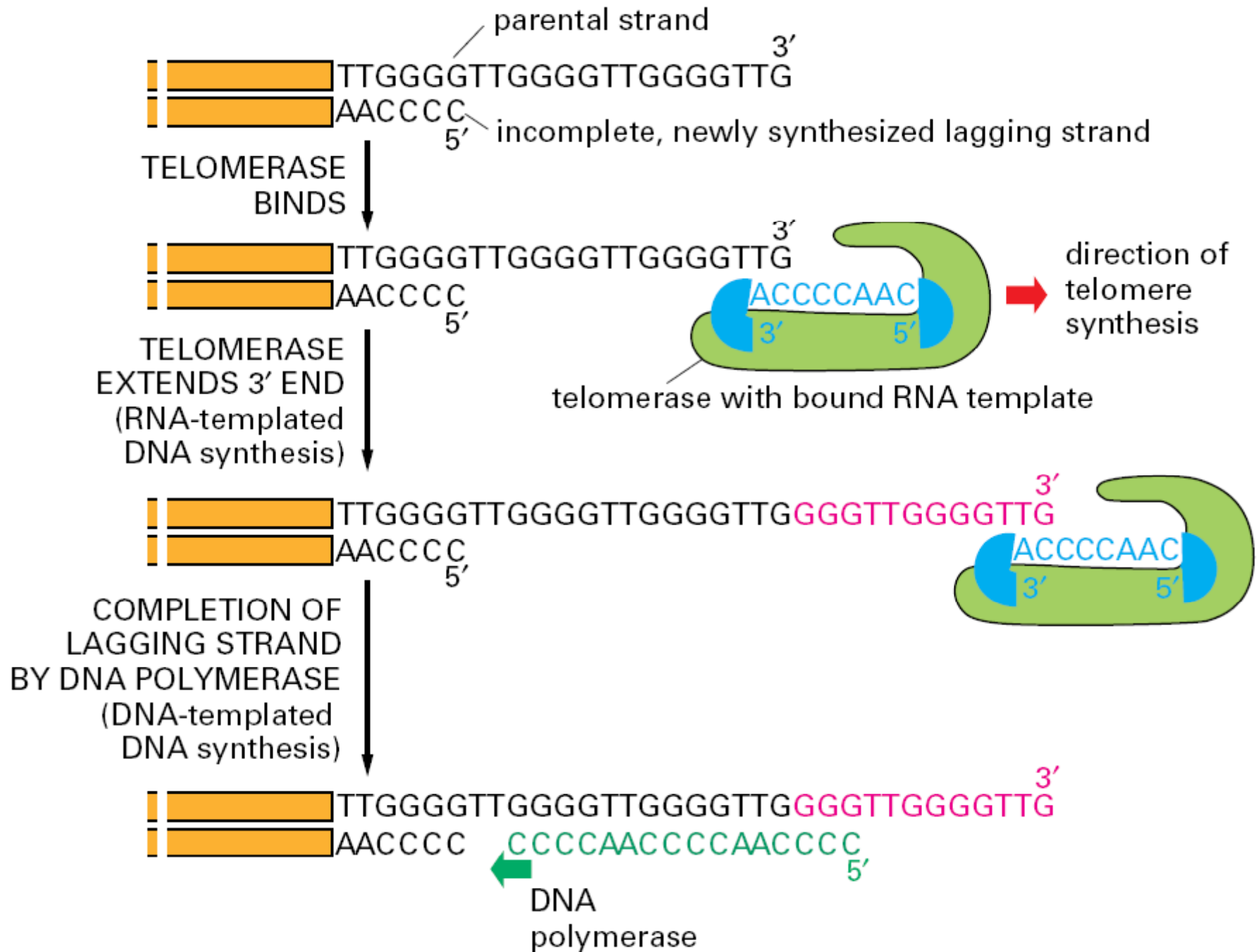


Verbindet die Okazaki Fragmente durch Versiegelung der Brüche im Zucker-Phosphat Rückgrat der neu synthetisierten DNA

4. Wie werden bei Eukaryoten Telomere repliziert?

Problem: verschieden lange Chromosomenenden!





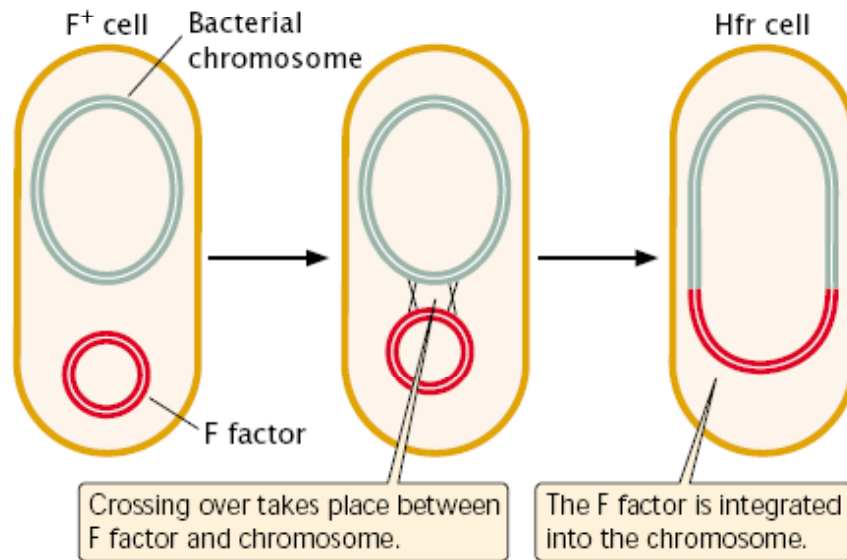
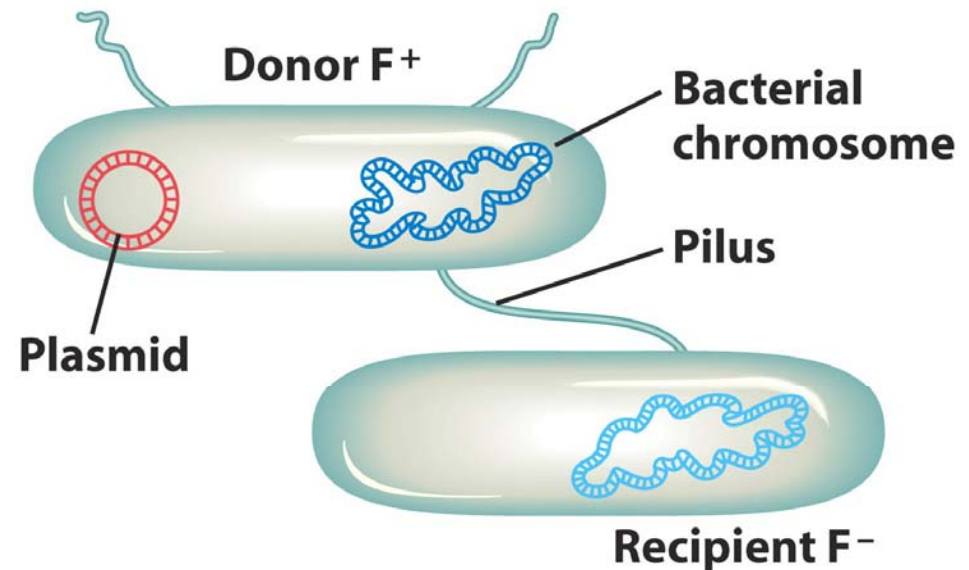
5. Wie liegt der F-Faktor in Hfr-, F⁺, F⁻ und F'-Stämmen vor?

F-Faktor:

Die Fähigkeit genetisches Material auf andere Bakterien zu übertragen.

F-Plasmide des Donors regulieren die Synthese von Pili, die den Kontakt mit den Empfängerzellen initiieren

→ Porenbildung für DNA-Transfer



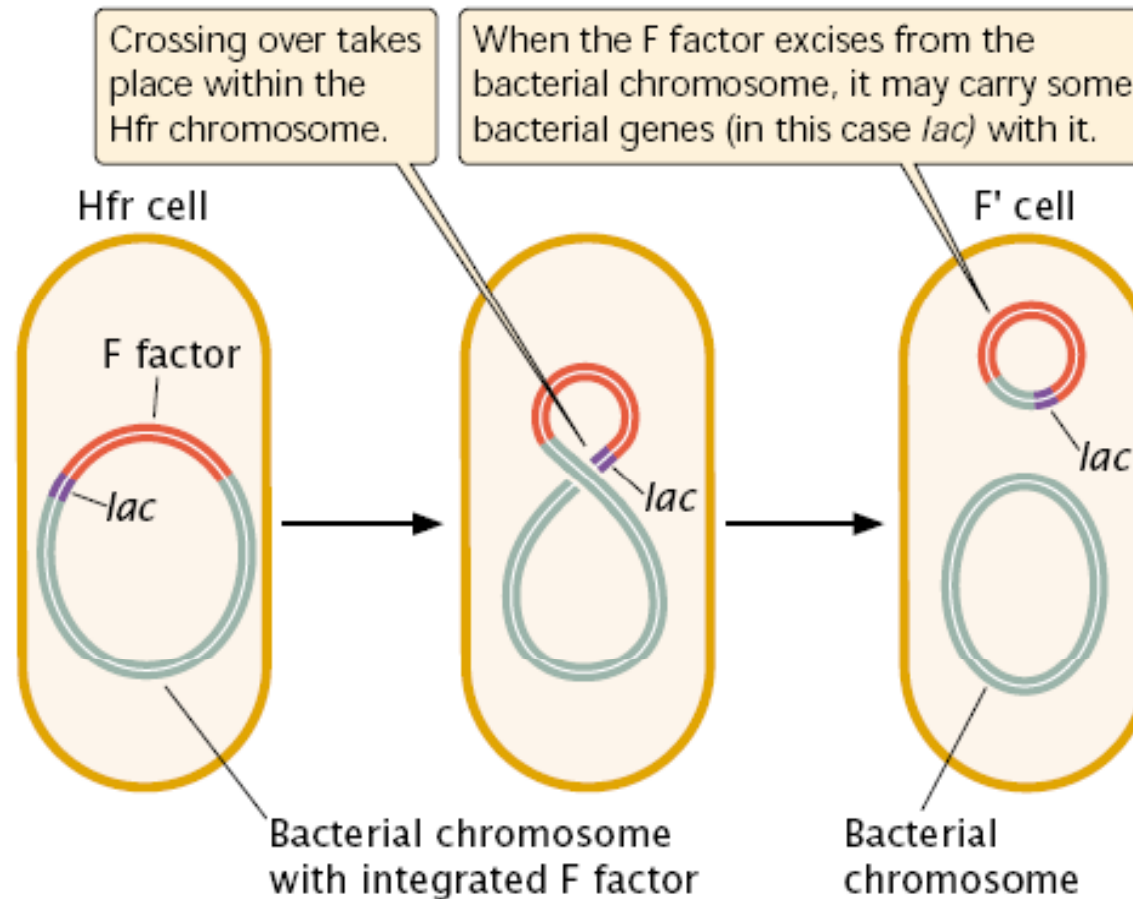
The F factor is integrated into the bacterial chromosome in an Hfr cell.

In **F⁺-Donorstämmen** liegt der F-Faktor als extrachromosomales Plasmid vor.

In **F⁻-Empfängerstämmen** existiert kein F-Faktor.

Hfr-Stämme haben den F-Faktor in ihr Wirtsgenom integriert.

In **F'**-Stämmen wurde der F-Faktor wieder aus dem Hfr-Chromosom herausgeschnitten und liegt als rekombinantes F-Plasmid im Cytoplasma vor:



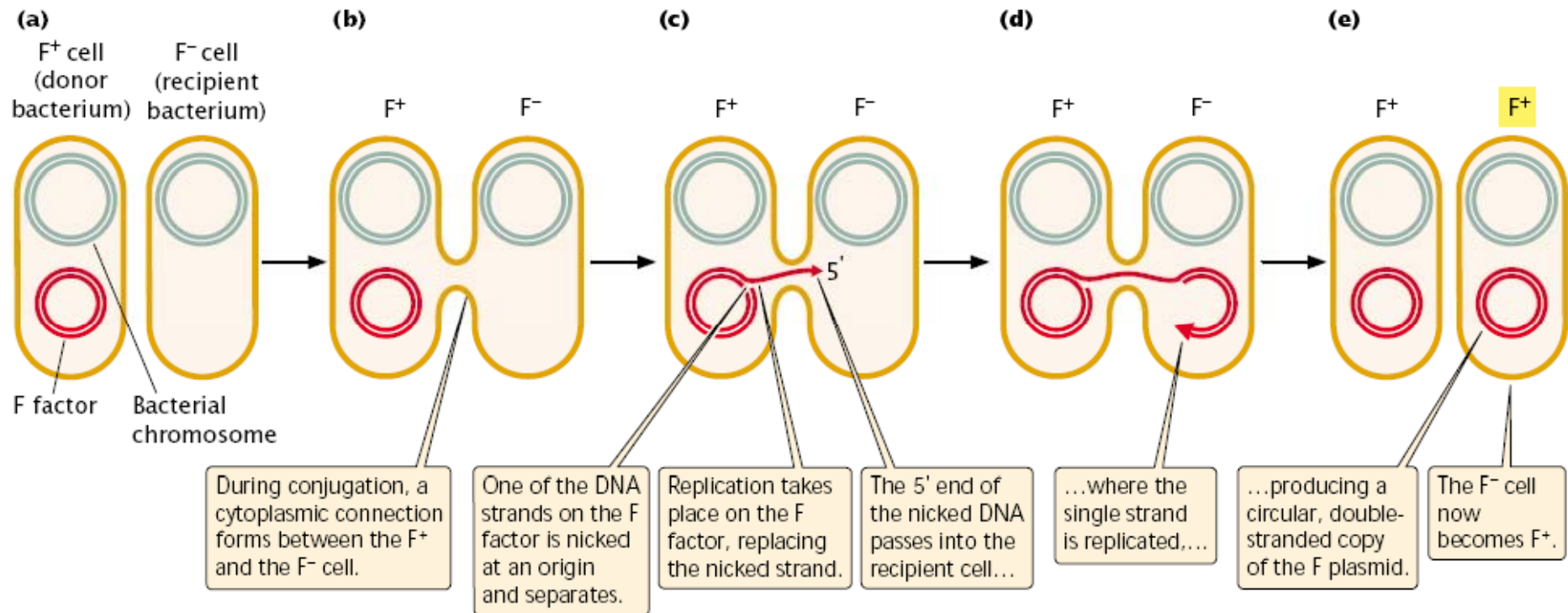
An Hfr cell may be converted into an F cell when the F factor excises from the bacterial chromosome and carries bacterial genes with it.

6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

<u>Konjugation</u>	Transfer von DNA zwischen zwei Bakterien über <i>direkten Zellkontakt</i>
<u>Transformation</u>	DNA wird aus <i>umgebendem Medium</i> aufgenommen und ins Genom integriert
<u>Transduktion</u>	Transfer von einem Bakterium zu einem anderen über einen <i>Virus</i>

6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

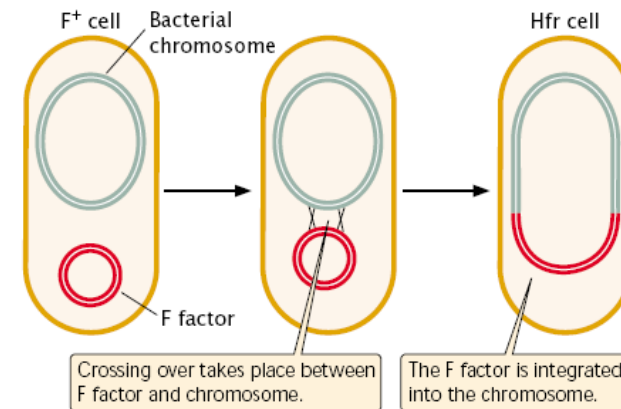
Konjugation A: F⁺ Zelle überträgt F-Faktor auf F⁻ Zelle



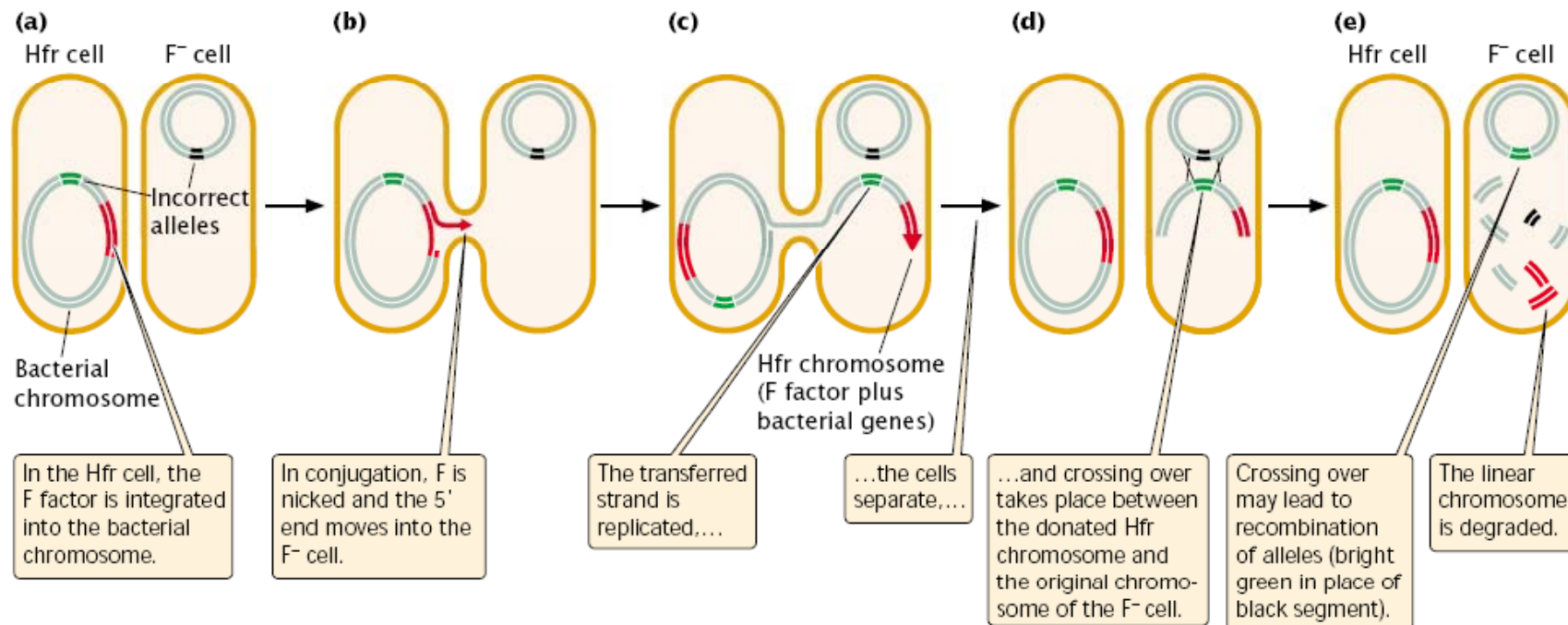
6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

Konjugation B:

Hfr Zelle überträgt F-Faktor auf F⁻ Zelle



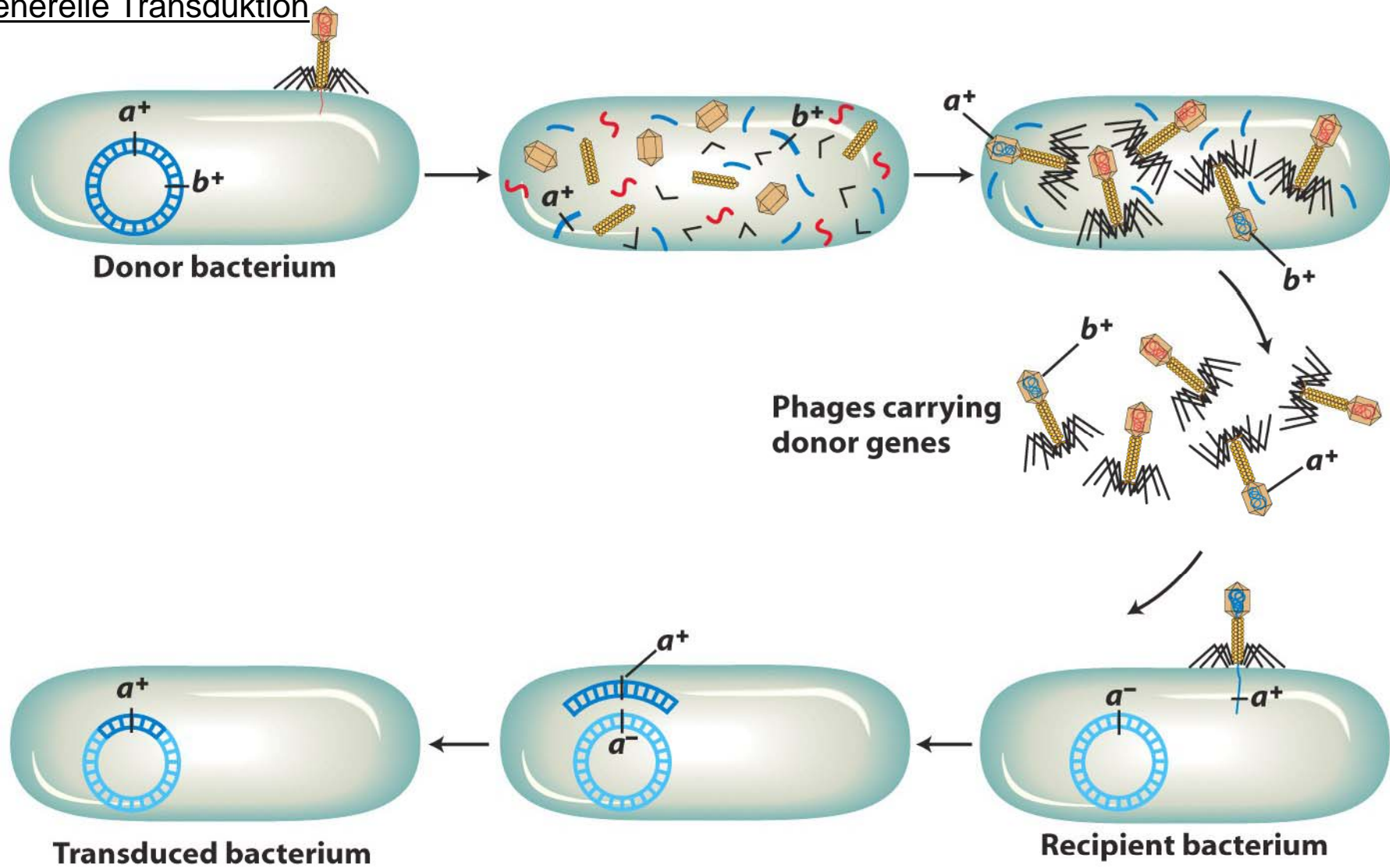
The F factor is integrated into the bacterial chromosome in an Hfr cell.



Bacterial genes may be transferred from an Hfr cell to an F⁻ cell in conjugation.

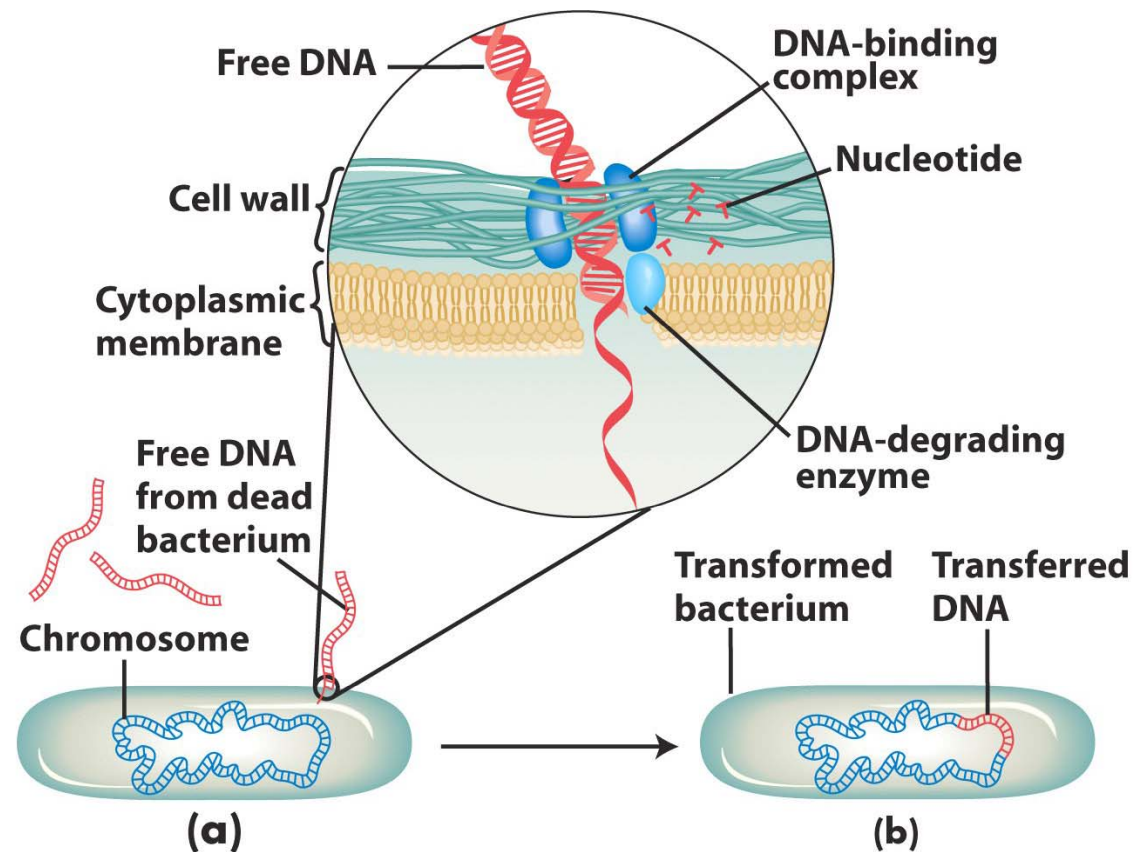
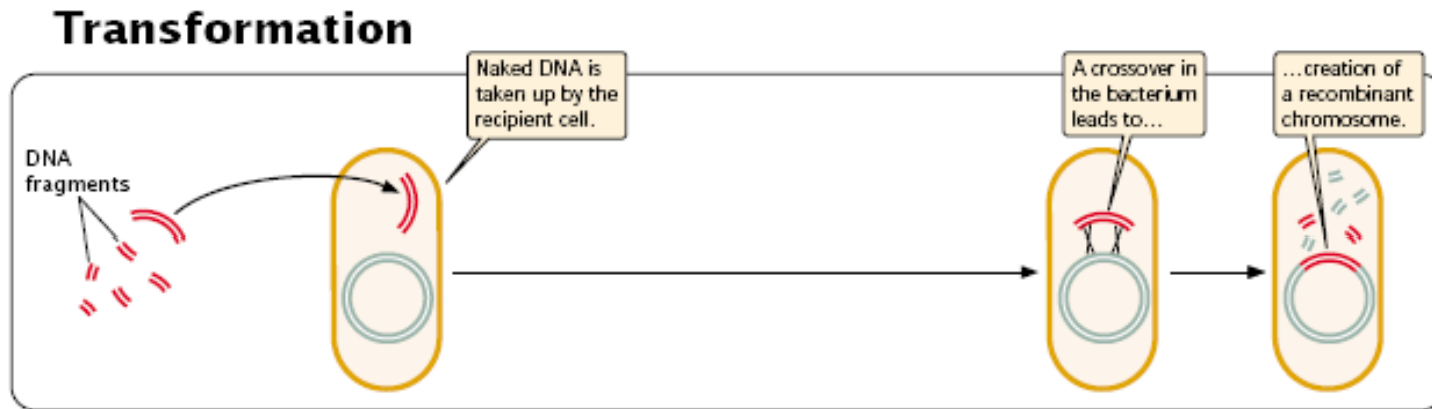
6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

Generelle Transduktion



6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

Transformation:



6. Welche Möglichkeiten des Gentransfers bei Bakterien kennen Sie?

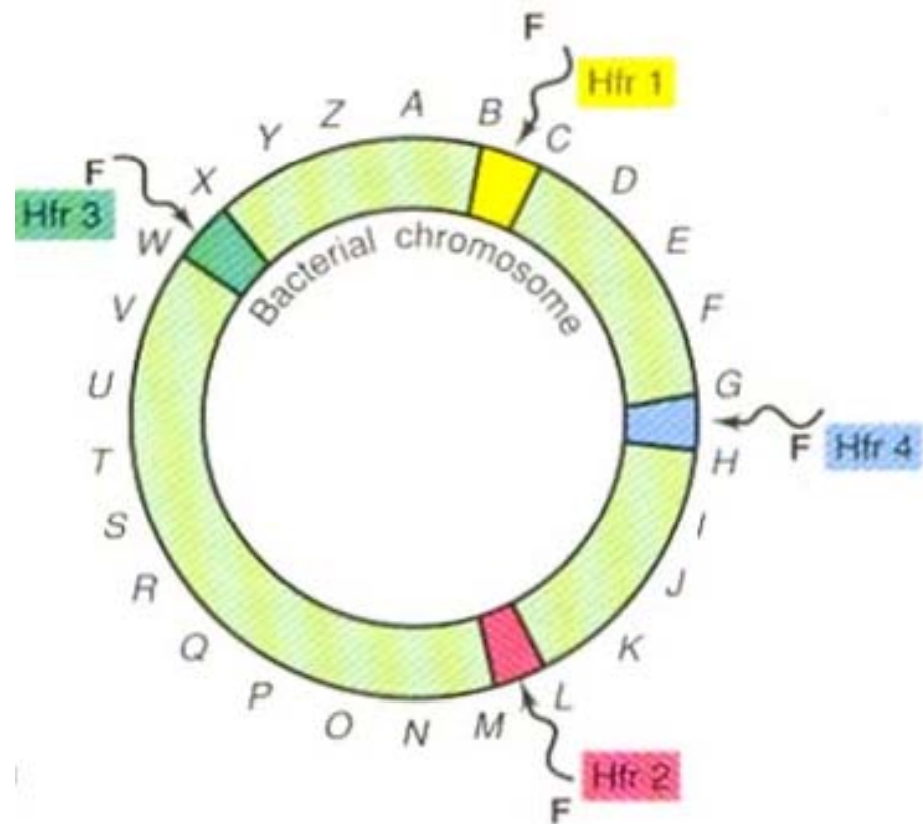
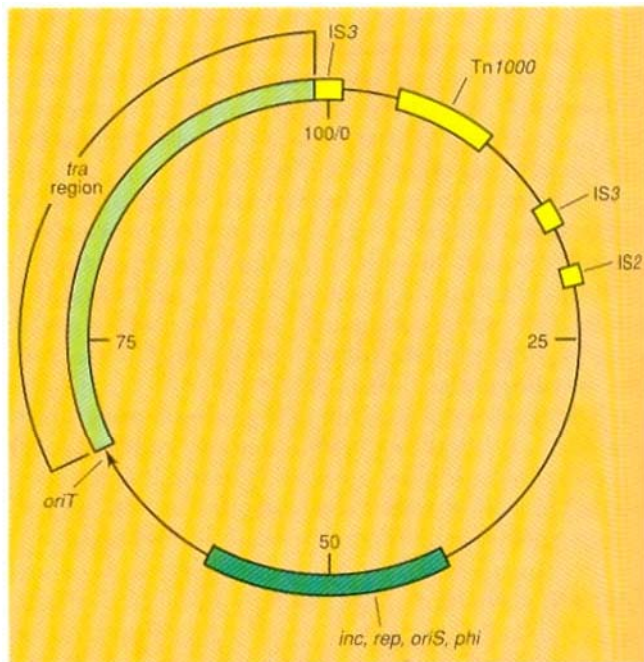
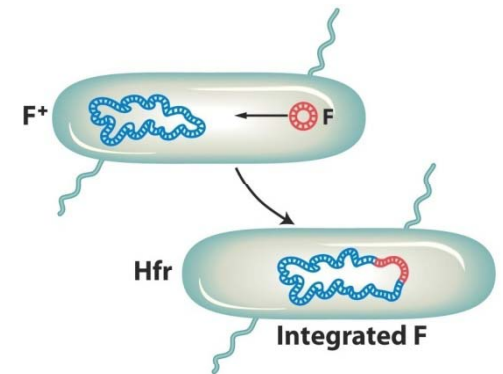
Konjugation, Transformation und Transduktion sind drei Prozesse zum Gentransfer in Bakterien.

Alle drei Prozesse beinhalten, dass die transferierte DNA mit dem bakteriellen Chromosom rekombiniert um stabil ins Wirtsgenom integriert zu werden!

7. Wie und wo integriert der F-Faktor ins bakterielle Chromosom?

Wo?

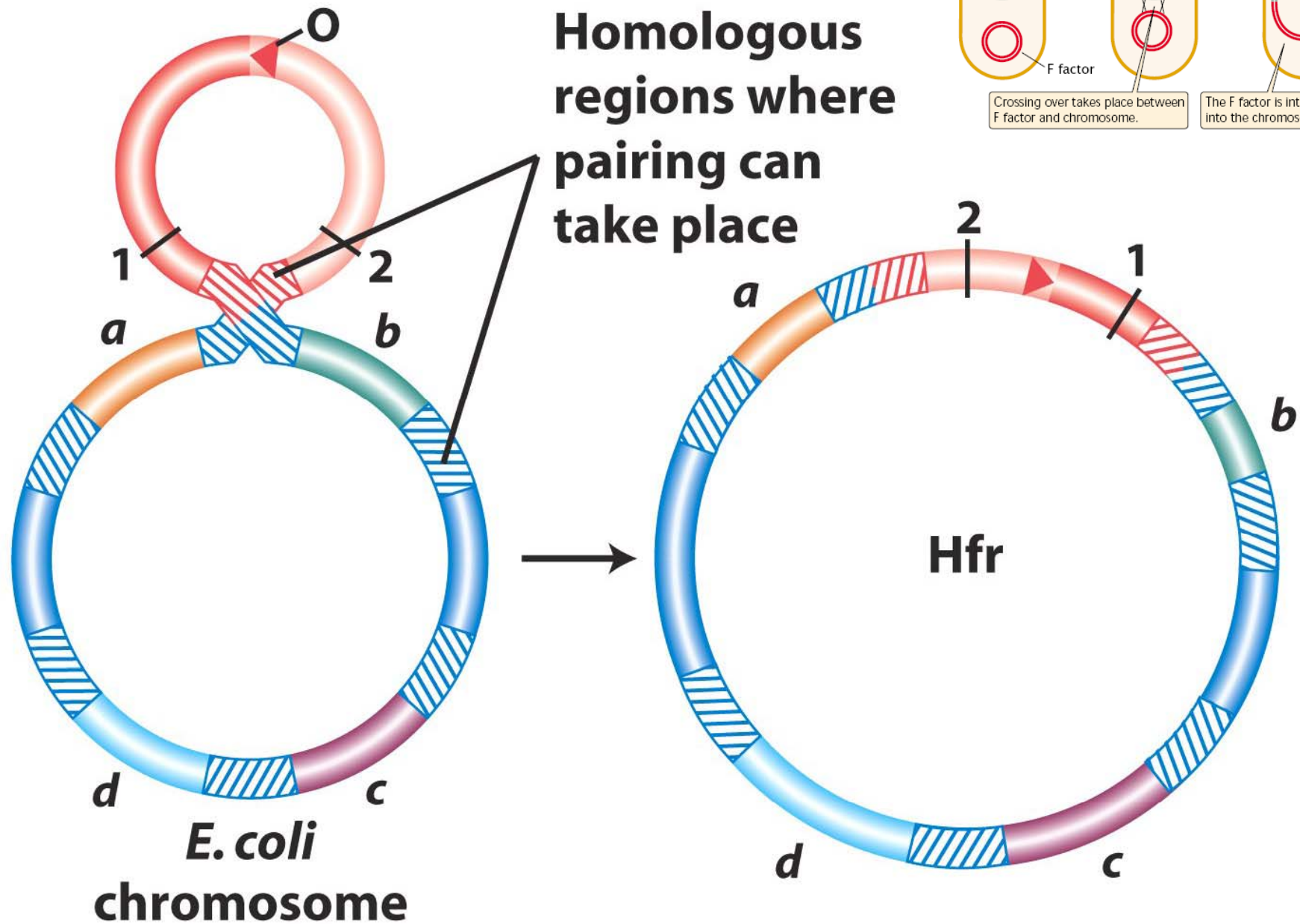
Integration des F-Plasmiden ins eigene Bakterienchromosom → Hfr:



Spezifische Stellen im Bakterienchromosom sind homolog zum F-Plasmid → **'Integration Sites'**

7. Wie und wo integriert der F-Faktor ins bakterielle Chromosom?

Wie?



8. Welche Stämme entstehen bei folgenden Kreuzungen?

$F^+ \times F^- \rightarrow F^+ + F^+$

$Hfr \times F^- \rightarrow Hfr + F^-$

$F' \times F^- \rightarrow F' + F'$

9. In E. coli übertragen vier verschiedene Hfr Stämme die aufgelisteten Marker in der dargestellten Abfolge:

Stamm 1: Q W D M T

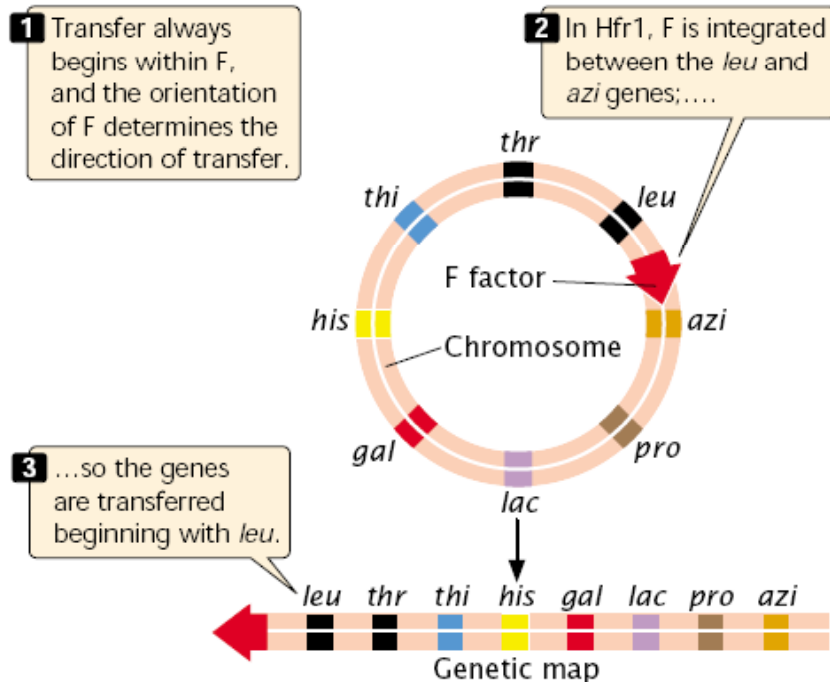
Stamm 2: A X P T M

Stamm 3: B N C A X

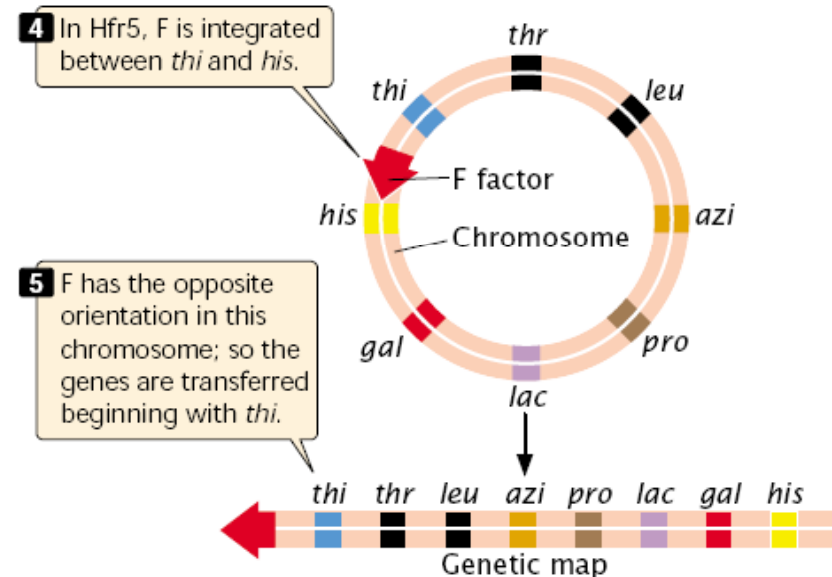
Stamm 4: B Q W D M

Bestimmen Sie die Abfolge der Gene/Marker auf dem circulären Chromosom.

(a) Hfr1

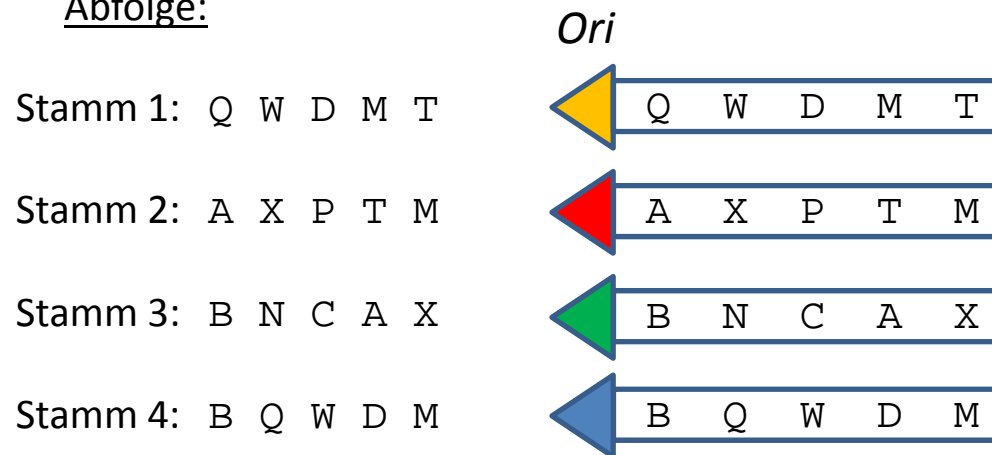


(b) Hfr5

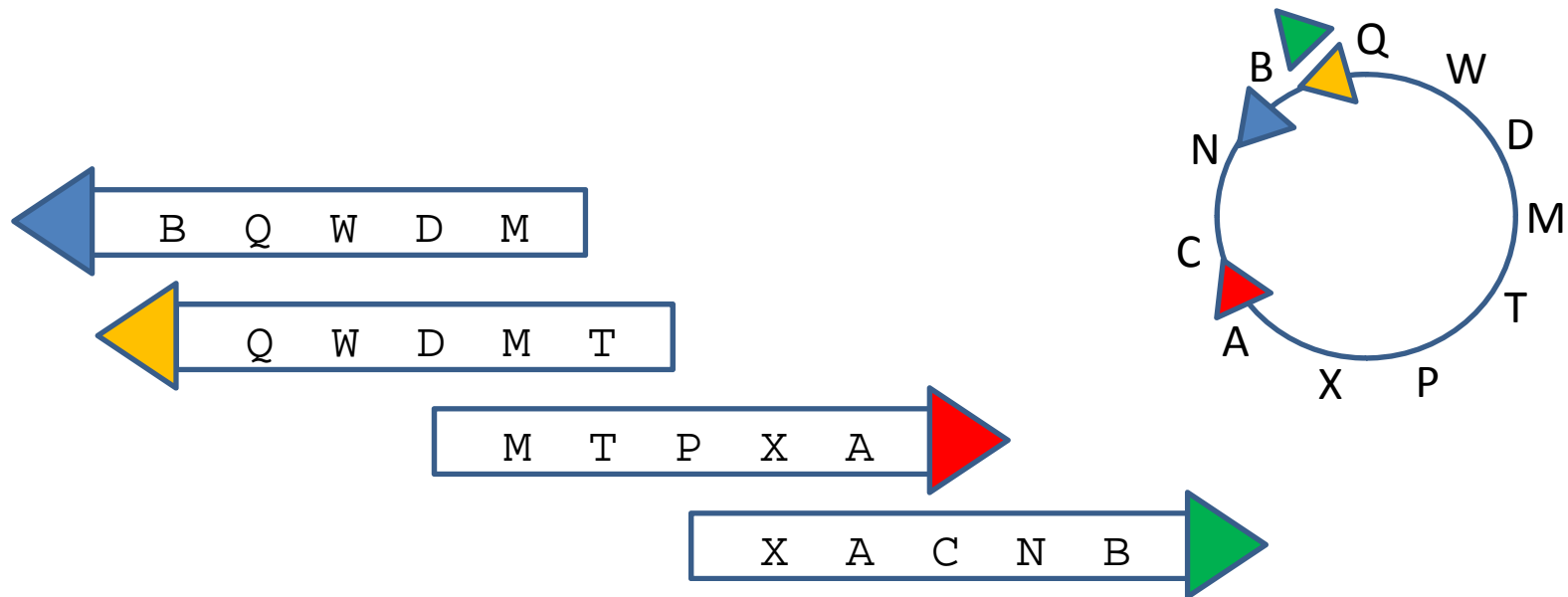


The orientation of the F factor in an Hfr strain determines the direction of gene transfer.
Arrowheads indicate the origin and direction of transfer.

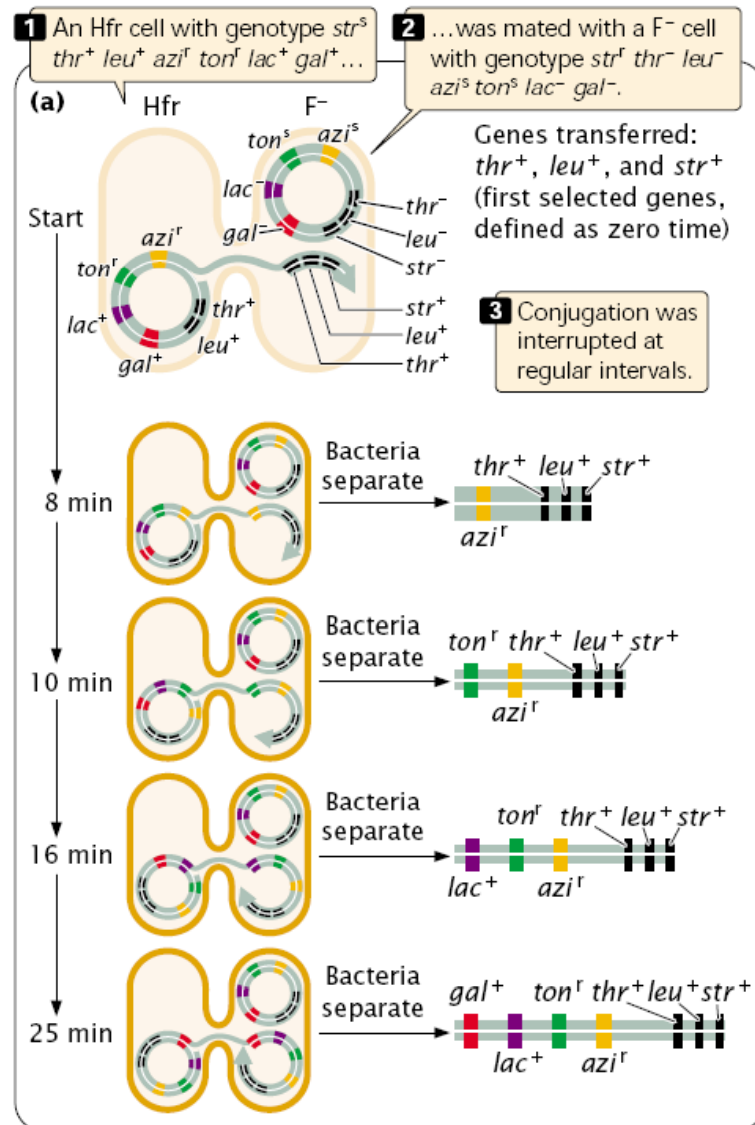
9. In E. coli übertragen vier verschiedene Hfr Stämme die aufgelisteten Marker in der dargestellten Abfolge:



Bestimmen Sie die Abfolge der Gene/Marker auf dem circulären Chromosom.



10. In einer Kreuzung (Hfr x F⁻) ist *leu*⁺ der erste Marker der übertragen wird. Die lineare Abfolge der anderen Marker ist unbekannt. Der Hfr Stamm ist für alle Marker prototroph, während der F⁻ Stamm für alle untersuchten Marker auxotroph ist. Welches ist die Abfolge der Marker wenn auf *leu*⁻ selektiert wird? Von den untersuchten Individuen sind 27% *ile*⁺, 13% *mal*⁺, 82% *thr*⁺ und 1% *trp*⁺.



- je näher Marker an *Ori*, desto höher Wahrscheinlichkeit des Transfers
 - spontane Bruchpunkte kreieren einen natürlichen Transfergradienten
- Die Frequenz von Rekombinanten ist eine Funktion der Anordnung im Verhältnis zum *Ori* für jeden Marker

→ Reihenfolge = *leu*⁺ - *thr*⁺ - *ile*⁺ - *mal*⁺ - *trp*⁺

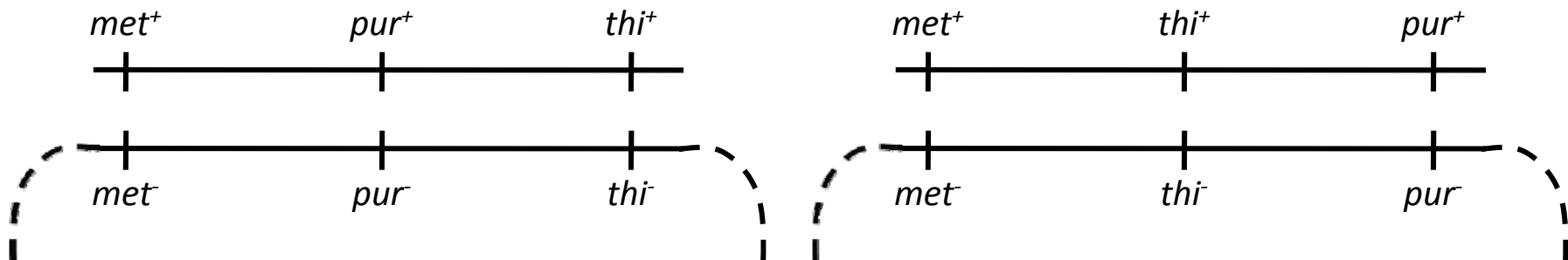
11. Sie kreuzen einen Hfr Stamm ($met^+ thi^+ pur^+$) mit einem F- Stamm ($met^- thi^- pur^-$). Das Unterbrechen der Kreuzung an verschiedenen Zeitpunkten zeigte, dass met^+ zuletzt in die Empfängerzelle gelangt. Rekombinanten werden auf Medium ohne Methionin selektiert. Es treten folgende Genotypen auf:

$met^+ thi^+ pur^+$	280
$met^+ thi^+ pur^-$	0
$met^+ thi^- pur^+$	6
$met^+ thi^- pur^-$	52

- Warum enthielt das Selektionsmedium kein Methionin?
- In welcher Reihenfolge liegen die Gene vor?
- Was sind die genetischen Abstände in Rekombinationseinheiten?

- met^+ ist der letzte Marker, der in die Empfängerzelle transferiert wird
- Selektion auf met^+ stellt sicher, dass alle anderen Loci dieser Kreuzung bereits transferiert wurden
- alle thi^- oder pur^- Genotypen müssen demnach durch Rekombination entstanden sein

da met^+ als letztes transferiert wird, sind nur 2 Folgen möglich:



- eine der 4 möglichen Rekombinantenklassen benötigt neben den 2 Cross-overs zur Integration der transferierten DNA zwei weitere Cross-over Ereignisse

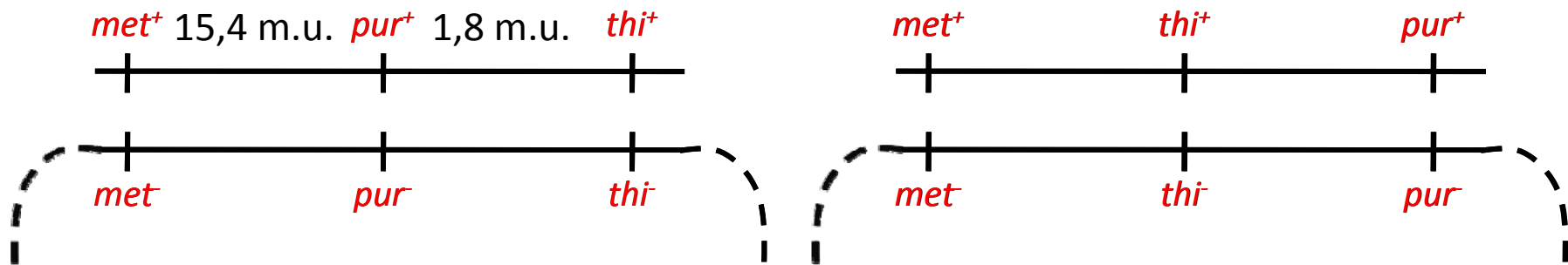
met⁺ *thi*⁺ *pur*⁺ 280

met⁺ *thi*⁺ *pur*⁻ 0



met⁺ *thi*⁻ *pur*⁺ 6

met⁺ *thi*⁻ *pur*⁻ 52



N = 338

met⁺ *pur*⁻ *thi*⁻ = 52/338 = 15,4 m.u.

met⁺ *pur*⁺ *thi*⁻ = 6/338 = 1,8 m.u.